

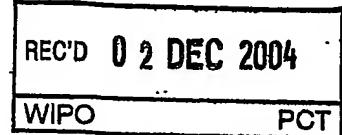
Europäisches
Patentamt

European Patent
Office

PCT/EP2004/008623

Office européen
des brevets

20/11/2004



Bescheinigung

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

Certificate

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Attestation

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Den Haag, den
The Hague,
La Haye, le

06.09.2004

Der Präsident des Europäischen Patentamts
Im Auftrag
For the President of the European Patent Office
Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R. Casimir

Patentanmeldung Nr.
Patent application no.
Demande de brevet n°

PCT/EP 03/09105

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation



Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°:

PCT/EP 03/09105

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):

1. SUNGENE GMBH & CO. KGAA - Gatersleben, Deutschland
2. SCHOPFER, Christel Renate - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
3. FLACHMAN, Ralf - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:

Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/ oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/ oder Folgeprodukten

Anmeldetag:
Date of filing:
Date de dépôt:

18. August 2003 (18.08.2003)

In Anspruch genommene Priorität(en)
Priority(ies) claimed
Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays: Deutschland

Tag:
Date:
Date: 13. November 2002
(13.11.2002)

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt: 10253112.9

Benennung von Vertragsstaaten : Siehe Formblatt PCT/RO/101 (beigefügt)
Designation of contracting states : See Form PCT/RO/101 (enclosed)
Désignation d'états contractants : Voir Formulaire PCT/RO/101 (ci-joint)

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Weitere Anmelder:

4. HERBERS, Karin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
5. KUNZE, Irene - Gatersleben, Deutschland (nur US)
6. SAUER, Matt - Quedlinburg, Deutschland (nur US)
7. KLEBSATTEL, Martin - Quedlinburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

16. Dezember 2002
(16.12.2002)

10258971.2

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238980.2
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238978.0
Deutschland	20. August 2002 (20.08.2002)	10238979.9

PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 07.08.2003 01:42:12 PM

IV-1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als: Name (FAMILIENNAME, Vorname) Anschrift:	
IV-1-1	DÖRPER, Thomas	
IV-1-2	c/o BASF Aktiengesellschaft	
	D-67056 Ludwigshafen	
	Deutschland	
IV-1-3	Telefonnr. 0621/60-94182	
IV-1-4	Telefaxnr. 0621/60-52538	
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	
	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist	
V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	
	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW	

Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen bio-synthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige ε-Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte ε-Cyclase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Carotinoidextrakten.

15 Carotinoide, wie beispielsweise Lycopin, Lutein, β-Carotin oder Zeaxanthin werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise 20 Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

25 Aufgrund ihrer fargebenden Eigenschaften werden die Carotinoide als Pigmentier- und Pigmentierhilfsstoffe eingesetzt. Zeaxanthin und Lutein finden beispielsweise bei der Eidotterpigmentierung Verwendung, β-Carotin dient als Orange-Pigment in Lebensmitteln und Getränken, Astaxanthin wird als Pigmentierhilfsstoff in der 30 Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

Darüber hinaus finden die Carotinoide, wie beispielsweise Lutein, Zeaxanthin, Lycopin, β-Carotin und Astaxanthin, aufgrund ihrer 35 antioxidativen Eigenschaften Anwendung bei der Supplementierung in der Human- und Tierernährung zur Therapie und Vorbeugung von Krankheiten.

Ein wirtschaftliches, biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Carotinoiden ist von großer Bedeutung.

Aus WO 00/32788 ist es bekannt durch kombinierte Überexpression von Carotinoid-Biosynthesegenen und Antisense-Verfahren bestimmte Carotinoidverhältnisse in Tagetespetalen zu beeinflussen.

Das in WO 00/32788 offenbarte Verfahren liefert zwar genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp einen veränderten Gehalt an Carotinoiden aufweisen, weist jedoch den Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Carotinoiden des "β-Carotinoid-Weges", wie beispielsweise β-Carotin oder Zeaxanthin und die Reinheit dieser Carotinoide und damit das Verhältnis an Carotinoiden des "β-Carotinoid-Weges", wie beispielsweise β-Carotin oder Zeaxanthin zu den Carotinoiden des "α-Carotinoid-Weges", wie beispielsweise α-Carotin oder Lutein noch nicht zufriedenstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten im Verhältnis zu Carotinoiden des "α-Carotinoid-Weges" aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen gefunden, die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige ε-Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte ε-Cyclase-Aktivität aufweisen.

Unter ε-Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer ε-Cyclase verstanden.

Unter einer ε-Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen ε-Ionon-Ring zu überführen.

Unter einer ε-Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in δ-Carotin umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter ε-Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein ε-Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge δ-Carotin verstanden.

Bei einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein ϵ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge δ -Carotin reduziert.

5

Unter einer reduzierten ϵ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer ϵ -Cyclase in einer pflanzlichen

10 Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

Die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge, oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. 15 Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder der ϵ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

20

Eine Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer ϵ -Cyclase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von ϵ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der ϵ -Cyclase). Vorzugsweise wird die ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. die ϵ -Cyclase-Proteinmenge oder die ϵ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständigen Fehlen der ϵ -Cyclase-Aktivität (bzw. des ϵ -Cyclase-Proteins oder der ϵ -Cyclase-mRNA).

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die ϵ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15) *in vitro* bestimmt werden, 40 wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (ph 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP+, NADPH und ATP zugegeben werden.

Die Bestimmung der ϵ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen 45 erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara

(Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53-64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stromaprotein aus Paprika, 0.2 mM NADP+, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9-15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast., J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072-17078).

Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Pflanze" die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.

Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordnbar ist, wird unter "Wildtyp" für die Reduzierung der ε-Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten eine Referenzpflanze verstanden.

Diese Referenzpflanze ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

Im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Reduzierung der ε-Cyclase-Aktivität durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen ε-Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch ε-Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die ε-Cyclase-dsRNA gegen ein ε-Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein ε-Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist.

Unter genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen, wird erfindungsgemäß verstanden, dass die Reduzierung der ϵ -Cyclase-

- 5 Aktivität durch die Verwendung von doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenzen erfolgt. Dieses Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference", auch als dsRNA-Verfahren bezeichnet) ist an sich bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; 10 WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

- 15 Unter „Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz“ wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, bei- 20 spielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

Dem Fachmann ist bewußt, dass die Ausbildung von doppelsträngigen 25 RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissozierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

- 30 Unter einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch ϵ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

35 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder

b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

- 40 Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

6

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 5

Unter dem Begriff „ ϵ -Cyclase-Transkript“ wird der transkribierte Teil eines ϵ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der ϵ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthaelt.

Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollstaendigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

25 In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder 30 mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-dsRNA Teile des ϵ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Sequenzen auftreten.

40 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die ϵ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine ϵ -Cyclase enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 45 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer 5 ϵ -Cyclase bewirken.

Ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer ϵ -Cyclase (ϵ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- 10 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
- 15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter ϵ -Cyclase-Nuklein-20 säuresequenz, bzw. das entsprechende Trankript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ. ID. NO. 4 oder ein Teil derselben verstanden.

"Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Ver-25 gleich zu der ϵ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und 30 mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines ϵ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines ϵ -Cyclase-Gens.

Eine 100 %ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem ϵ -Cyclase 35 Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der ϵ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. 40 So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der ϵ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die ϵ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von ϵ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entspre-45 chen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines ϵ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren beispielsweise in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 5 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, 10 bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

15 Zur Transformation der Pflanze mit einer ϵ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die ϵ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

20 Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
- 25 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

30 Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst die ϵ -Cyclase-dsRNA

- 35 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und
- 40 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA- "sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer ϵ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ. ID. NO. 13 oder ein Teil der selben verstanden.

5 Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-
10 Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.
15

Zur Herstellung der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen und insbesondere deren Expressionskassetten zur Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tagetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

20 SEQ. ID. NO. 6: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ. ID. No. 7: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der
25 ϵ -Cyclase

SEQ. ID. No. 8: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

30 SEQ. ID. No. 9: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der ϵ -Cyclase

SEQ. ID. No. 13: Sense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

35 SEQ. ID. No. 14: Antisense-Fragment des ϵ -Cyclase-Promotors

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen 40 der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

45 Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und

"antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine
 5 Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in
 10 einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2):245-250).

15 Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer ε-Cyclase
 20 gerichtet, so umfaßt sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze „Spreading“).

25 Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der
 30 beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.
- c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die
 35 eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

40 Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

45 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen

11

Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf 5 dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate 10 einer ϵ -Cyclase aufweisen.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der ϵ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

15 In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der ϵ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

20 In einer besonders bevorzugten -Ausführungsform erfolgt daher die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, 25 besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ. ID. NO. 10 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder 30 den "sense"-Strang einer ϵ -Cyclase-dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor insertiert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfundungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom 35 vorteilhaft.

Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine 40 effizienter Verminderung bewirken.

Die Methoden der dsRNA, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional 45 gene silencing" (TGS) bezeichnet.

- In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, 5 Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iilliaceae oder Lamiaceae.
- 10 Besonders bevorzugt verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, 15 Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochaeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, 20 Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder 25 Zinnia verwendet.

Ganz besonders bevorzugt verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder 30 Tagetes patula.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus der Pflanze, besonders bevorzugt aus den Blütenblättern der Pflanzen angeschlossen.

40 Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Isolierung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen 45 Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weite-

rer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether.

10 Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437-440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609-618) beschrieben.

15 Vorzugsweise sind die biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte von Zeaxanthin ausgewählt aus der Gruppe Lycopin, β -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Neoxanthin, Capsorubin, Capsanthin.

20 Unter biosynthetischen Zwischenprodukten von Zeaxanthin werden Carotinoide verstanden, die im Biosyntheseschema auf dem biochemischen Weg zu Zeaxanthin liegen. Vorzugsweise sind diese Zwischenprodukte Lycopin und/oder β -Carotin.

25 Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden Carotinoide verstanden, die im Biosyntheseschema von Zeaxanthin ableiten, wie beispielsweise Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin. Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden aber auch insbesondere solche Carotinoide verstanden, die sich beispielsweise durch Einbringen weiterer enzymatischer Aktivitäten in die Pflanze biosynthetisch von Zeaxanthin und diesen Zwischenprodukten ableiten lassen.

35 Beispielsweise kann durch Verursachung einer Ketolase-Aktivität in genetisch veränderten Pflanzen, beispielsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in eine Ausgangspflanzen, die genetisch veränderte Pflanze in die Lage versetzt werden, ausgehend von Carotinoiden des β -Carotinoid-Weges, wie 40 beispielsweise β -Carotin oder Zeaxanthin, Ketocarotinoide wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin herzustellen.

Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden daher auch insbesondere Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin verstanden.

5

Ein besonders bevorzugtes Folgeprodukt von Zeaxanthin ist Astaxanthin.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man Expressionskassetten, enthaltend ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in eine Ausgangspflanze einführt.

15 Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor

20 und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anord-

25 nung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulatoriver Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

30 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

35 Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

"Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

5

Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294;

10 Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202).

15 Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promoter (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962-4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Dop-
20 pelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor; den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der valkuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), Plant. Mol. Biol. 36, 89-99, Hillebrand et al. (1996), Gene, 170, 197-200) sowie weitere
25 30 Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997)

35 Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein
40 durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls
45 verwendet werden.

16

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).

- 10 Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) The Plant Cell 15:4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der pinII Gens (Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeyer et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Ekelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) The Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

5 Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451).

10 Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder besonders bevorzugt die modifizierte Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721).

15 Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor oder
20 der g-Zein Promotor.

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11 und Berger et al. (1989) Proc
25 Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der doppelsträngige ε-Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen in den erfindungsgemäßen
30 Pflanzen.

Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren und in den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen sind blütenspezifische Promotoren.

35 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen, eine doppelsträngige ε-Cyclase-Ribonukleinsäure-Sequenz transkriptierende, Nukleinsäuresequenz und vorzugsweise
40 einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning:
45 A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Har-

bor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

- 5 Die vorzugsweise insertierte Nukleinsäuren kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (*rbcS*) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

15

Bei besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als *KpnI/BamHI* Fragmente mit einem ATG-Kodon in der *NcoI* Schnittstelle:

20

pTP09

*KpnI*_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA

25 ATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCCGTACTCCTTCCGCCGCCGCCGTG
TAAGGTACCGGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCATAAGAGAAA
TCC_BamHI

pTP10

30

*KpnI*_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCCGTACTCCTTCCGCCGCCGCCGTG
TAAGGTACCGGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCATAAGAGAAA
TACGACTGCGCTG

35 GATCC_BamHI

pTP11

*KpnI*_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTCACTCTCTCAAGCTATCCTCTCGTTCTGTC
40 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTCAACTTTCCCTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCAATATCACCAACCTCCGCCCGTACTCCTTCCGCCGCCGCCGTG
TAAGGTACCGGGCGATTCGTGCCTCAGCTGCAACCATAAGAGAAA
ATCC_BamHI

45 Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpep-

tid der kleinen Untereinheit der Ribulosebisphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids res. 16: 11380).

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener 10 Organismen bestehen.

Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M; Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiAch5. 20 EMBO J. 3: 835-846).

25

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerreplace", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

30

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

35

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiAch5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

40

Die Übertragung von Nukleinsäuresequenzen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

45

Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die so genannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die
5 Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor 15 kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

20 Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

25 Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren.

Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann 35 in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase enthalten.

21

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer doppelsträngigen ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, bei-
5 spielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

- 10 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res.16 :11380),
- 15 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen,
20 die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

Wie vorstehend erwähnt, enthält die genetisch veränderte Pflanze
25 in einer bevorzugten Ausführungsform eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-
30 Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

35 Bevorzugte, genetisch veränderte Pflanze sind ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassiceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae,
40 Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delo-

nia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Escholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helianthemum, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochaeris,
5 Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leon-todon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium; Sinap-
10 sis, Sorbus, Spartium, Tecomaria, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

Ganz besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanze sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta oder
15 Tagetes patula.

Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20 Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten, insbesondere zur Herstellung von Lycopin, β-Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin,
25 Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin und insbesondere zur Herstellung von Astaxanthin verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen weisen
30 im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt mindestens eines Carotinoids auf, ausgewählt aus der Gruppe Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten.

Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

Von Menschen und Tieren verzehrbar erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Carotinoidhaltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.
45

Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert,
5 ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 10 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).
- 15 Beispiel 1: Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen ε-Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz-Expressionskassetten für die blütenpezifischen Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*
- 20 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenpezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 25 9298-10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711-1721)

Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) mit einander verbunden sind.

Die cDNA, die für den AP3 Promoter (-902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID No. 15) und PR10 (SEQ ID No. 18) hergestellt.

40 Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (-902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50 μl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

24

- 1 µl genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 verd hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15)
- 5 - 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

10 Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minute
15		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert

20 und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klons pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 25 9298-10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

30

Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200-9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID No. 15) und Primern PR9 (SEQ ID No. 17) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die 35 Region 9526-9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 16) und PR10 (SEQ ID No. 18) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

40 Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200-9771 und 9526-9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

25

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15) bzw. PR8 (SEQ ID No. 16)
- 0,2 mM PR9 (SEQ ID No. 17) bzw. PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 - 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 10 1 X 94°C 2 Minuten
- 35 X 94°C 1 Minute
- 50°C 2 Minuten
- 72°C 3 Minuten
- 15 1 X 72°C 10 Minuten

Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende 20 Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670–9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten 25 war:

- 0,5 µg A7/9
- 0,25 µg A8/10

30 Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 35 - 50 µM dNTPs
- 2 µl 1 X Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterverision 40 AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 15) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 18) amplifiziert.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

26

Die PCR zur Amplifikation des AP3P-Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 5 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10 X PCR-Puffer (Stratagene)
- 10 - 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

15	1 X	94°C	2 Minuten
	35 X	94°C	1 Minute
		50°C	1 Minuten
		72°C	1 Minuten
20	1 X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID No. 15 und PR10 SEQ ID No. 18 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

30 Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

35 Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245-50) sowie der Primer PR40 (Seq ID No. 20) und Primer PR41 (Seq ID No. 21) her-
40 gestellt.

Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl p35SGUS INT
 - 0,25 mM dNTPs
 - 0,2 µM PR40 (SEQ ID No. 20)
 - 0,2 µM PR41 (SEQ ID No. 21)
 5 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
 - 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10 1X 94°C 2 Minuten
 35X 94°C 1 Minute
 53°C 1 Minute
 72°C 1 Minute
 15 1X 72°C 10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) 20 kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klons mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

25 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp SalI-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem SalI-BamHI 30 geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3' Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heißt pJAI1 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

35 In der Abbildung 2 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 2: Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

5

Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID No. 22) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID No. 23) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

15

Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert.

20 Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser 25 mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5 µg GesamtRNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharma-30 cia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID No. 19) in cDNA umgeschrieben.

35 Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

40

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR42 (SEQ ID No. 22)
- 0,2 µM PR43 (SEQ ID No. 23)
- 45 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5	-	1	µl	cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
	-	0,25	mM	dNTPs
	-	0,2	µM	PR44 (SEQ ID No. 24)
	-	0,2	µM	PR45 (SEQ ID No. 25)
	-	5	µl	10X PCR-Puffer (TAKARA)
10	-	0,25	µl	R Taq Polymerase (TAKARA)
	-	28,8	µl	Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

15	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minute
		72°C	1 Minute
20	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

25 Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit
30 dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID No. 4) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klon wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

35 Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region
40 der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminalen Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.
45 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI ge-

schnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 bp 5' terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5' terminalen Region 5 der Epsilon-Cyclase.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID No. 42) und PRCHRC3 (SEQ ID No. 43) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. 15 Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt pJCI3.

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten 25 Inverted-Repeat Transkripts in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 3, Konstruktkarte).

In der Abbildung 3 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5' Region der Epsilon-Cyclase aus Tagetes erecta (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment 35 intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5' Region der Epsilon- cyclase aus Tagetes erecta (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

40 Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 4, Konstruktkarte).

In der Abbildung 4 beinhaltet Fragment CHRC den Promoter 45 (1537 bp), Fragment 5sense die 5' Region der Epsilon-Cyclase aus Tagetes erecta (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die

31

5' Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Anti-sense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

5 Beispiel 3: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

10 Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID No. 26) und eines antisense spezifischen Primers (PR47

15 SEQ ID No. 27) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

20 Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* erfolgte wie unter Beispiel 2 beschrieben.

Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID No. 19) 25 beschrieben.

Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

30 Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
35 - 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR46 (SEQ ID No. 26)
- 0,2 µM PR47 (SEQ ID No. 27)
- 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
40 - 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

32

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR48 (SEQ ID No. 28)
- 0,2 µM PR49 (SEQ ID No. 29)
- 5 - 5 µl 10 X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen
 10 durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		58°C	1 Minute
15		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 26 und SEQ ID No. 27 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID
 20 No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49
 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den
 25 PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID No. 4) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klonen wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

30

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region
 35 der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

40 Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-SalI geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 bp 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält,
 45 heißt pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle

Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragmente 3' terminale Region der Epsilon-Cyclase.

Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacterium-
5 vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-
Repeat Transkripts in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwen-
dung des binären Vektors pSUN5 (W002/00900). Zur Herstellung des
Expressionsvektors pSSAI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment
aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert
10 (Abbildung 5, Konstruktkarte).

In der Abbildung 5 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten
AP3P Promoter (771 bp), Fragment sense die 3' region der Epsilon
cyclase aus Tagetes erecta (435 bp) in sense Orientierung, Frag-
15 ment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment
anti die 3' region der Epsilon cyclase aus Tagetes erecta (435 bp)
in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Poly-
adenylierungssignal von CaMV.

20 Beispiel 4: Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 25 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457-463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus Tagetes erecta, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 ug genomische DNA in einem
30 25 ul Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 ul verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase reli-
giert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID No. 30) und PR51 (SEQ ID No. 31) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment herge-
stellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-
35 Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5' terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abbildung 6).

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

40

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

34

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR50 (SEQ ID No. 30)
- 0,2 µM PR51 (SEQ ID No. 31)
- 5 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen
10 durchgeführt:

	1X	94°C	2 Minuten
	35X	94°C	1 Minute
		53°C	1 Minute
15		72°C	1 Minute
	1X	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in
einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfrag-
20 ment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 6).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in
den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequen-
zierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID
25 No. 11. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikations-
experiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotid-
sequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen
30 mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested
primers) durchgeführt.

Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem ent-
halten war:

- 35
- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
 - 0,2 mM jedes dNTPs
 - 0,2 µM PR60 (SEQ ID No. 32)
 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)
 - 40 - 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 - 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
 - mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequen-
45 zen (a/c/g/t)tcga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 1X 93°C: 1 Min., 95°C: 1 Min.
5 5X 94°C: 30 Sek., 62°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.
1X 94°C: 30 Sek., 25°C: 3 Min., ramp to 72°C in 3 Min.
72°C: 2,5 Min
15X 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;
94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;
10 94°C: 10 Sek., 29°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.
1X 72°C: 5 Min.

Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 15 - . 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes
(hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 0,2 µM PR61 (SEQ ID No. 33)
20 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)
- 2 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 21 ul aufgefüllt

25 Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

- 12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;
30 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten
1X 72°C: 5 Minuten

Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 35 - 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes
(hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,8 mM dNTP
- 0,2 µM PR63 (SEQ ID No. 34)
40 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)
- 10 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 100 ul aufgefüllt

45 Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt;

20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten
1X 72°C: 5 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in
5 einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfrag-
ment der Epsilon-Cyclase enthält (Abbildung 7).

Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in
den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequen-
10 zierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID
No. 12. Diese Sequenz ist identisch mit der ecyclase Region in-
nerhalb der Sequenz SEQ ID No. 11, die mit der IPCR Strategie
isoliert wurde, und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in
der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

15 Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID No. 11) des
Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert
wurde, enthält, heißt pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der
IR Konstrukte verwendet.

20 Beispiel 5: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette
für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cy-
clase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen
die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

25 Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus
Promoterfragmenten der Epsilon-cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte
unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezi-
fischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis* (siehe Beispiel 1) oder des
30 blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession
no. AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils
ein Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in korrekter Orientierung
(Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Pro-
moterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Frag-
35 ment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 1) mit-
einander verbunden sind.

Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von
Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 4) und der Primer
40 PR124 (SEQ ID No. 36) und PR126 (SEQ ID No. 38) bzw. der Primer
PR125 (SEQ ID No. 37) und PR127 (SEQ ID No. 39) hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

5 - 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
 - 0,25 mM dNTPs
 - 0,2 µM PR124 (SEQ ID No. 36)
 - 0,2 µM PR126 (SEQ ID No. 38)
 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 10 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
 - 28,8 µl Aq. Dest.

Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte 15 in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
 - 0,25 mM dNTPs
 - 0,2 µM PR125 (SEQ ID No. 37)
 20 - 0,2 µM PR127 (SEQ ID No. 39)
 - 5 µl 10X PCR-Puffer (TAKARA)
 - 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
 - 28,8 µl Aq. Dest.

25 Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
30	72°C	10 Minuten

Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in 35 einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-SalI sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, 40 wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID No. 11. Diese Klone wurden daher für die Herstellung 45 eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-SalI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361Bp 10 PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch die 15 Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO. 43) und PRCHRC5' (SEQ ID NO. 42) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des 30 ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt cs45.

Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des 35 AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3' Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJAI1 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. 40 Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 1 identische Sequenz.. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp SalI-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält, heißt cs46.

5

Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in Tagetes erecta erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

10

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 8, Konstruktkarte).

15

In der Abbildung 8 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense

20 Orientierung.

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 9, Konstruktkarte).

25

In der Abbildung 9 beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon- Cyclase in antisense Orientierung.

35

Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abbildung 10, Konstruktkarte)

40

In der Abbildung 10 beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment AP3P das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

Beispiel 6: Herstellung transgener Tagetes Pflanzen

- Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497) pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20 bis 200 $\text{~E}/3$ bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 ~E , für 4 bis 8 Wochen.
- 10 Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm^2 werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.
- 15 Der Agrobakterium *tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid PS5AI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat \times 7 H_2O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakterien-suspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.
- Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylamino-purin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 $\text{~E}\text{Mol}/\text{m}^2 \times \text{sec}$, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer

41

Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- 5 Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure
10 (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure GA₃, zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhaft 15 hafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden.
20 Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
25
- Die Zugabe von AgNO₃ (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
30
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
35
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmehrmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.
40 Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5AI3 wurde erhalten: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

Beispiel 7: Charakterisierung der transgenen Pflanzen

Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen aus Beispiel 6 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver 5 (etwa 250 bis 500 mg) mit 100 % Aceton extrahiert (dreimal je 500 ul). Das Lösungsmittel wurde evapiert und die Carotinoide in 100 ul Aceton resuspendiert.

Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono-
10 und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551-558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

15 Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in Tagetespetalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [μ g/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

20 Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise 25 β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 1

30

Pflanze	Lutein	b-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (-86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (-63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (-86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (-70%)
CS 30-4	68 (-85%)	9,1 (+42%)	5,7 (-17%)	61 (+5%)	144 (-73%)
Kontrolle	280	4,1	2,6	42	329
CS 32-9	69 (-75%)	5,5 (+34%)	2,3 (-12%)	25 (-38%)	102 (-69%)

40

Vergleichsbeispiel 1: Reduzierung der ε-Cyclase-Aktivität in *Tagetes erecta* durch Antisense

Unter Verwendung herkömmlicher, dem Fachmann bekannter Methoden 45 wurde als Vergleichsbeispiel eine *Tagetes erecta* Antisense-Linie CS32-9 hergestellt bei der die Reduzierung der ε-Cyclase-Aktivität

PF 53864

43

durch Antisense erfolgte. Das Carotinoidprofil dieser Linie (CS32-9), gemessen nach vorstehend beschriebener Methode ist ebenfalls in Tabelle 1 dargestellt.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine, durch doppelsträngige ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte, reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die
- 15 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine ϵ -Cyclase enthält.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur jeweils einen "sense"-RNA-Strang enthält, umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und einen "antisense"-RNA-Strang enthält, der zu dem "sense"-RNA-Strang im wesentlichen komplementär ist.
- 30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer ϵ -Cyclase aufweisen.
- 35 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen ϵ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines blüten spezifischen Promoters erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iilliaceae oder Lamiaceae verwendet.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delönia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Sénecio, Silene, Silphium, Sinapis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.
- 30 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula verwendet.
- 35 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte aus den Pflanzen isoliert.
- 40 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Lycopin, β -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3'-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin Adonixanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin, Capsorubin, und Capsanthin.
- 45

12. Ribonukleinsäurekonstrukt, enthaltend RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- 5 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ϵ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

10 13. Nukleinsäurekonstrukt, transkripierbar in

- 15 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- ϵ -Cyclase Transkriptes, und
b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

20 14. Nukleinsäurekonstrukt, umfassend

- 25 a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines ϵ -Cyclase-Gens, und
b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementär ist.

30 15. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13, wobei die aus dem ϵ -Cyclase-Tränkript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ. ID. NO. 4 beschrieben ist.

35 16. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 14, wobei die Nukleinsäuresequenz des Promotorbereichs des ϵ -Cyclase-Gens durch SEQ. ID. NO. 13 beschrieben ist.

40 17. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang kovalent in Form eines invertierten Repeats miteinander verbunden sind.

18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich funktionell verknüpft einen Promotor enthält.
- 5 19. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man einen blütenspezifischen Promotor verwendet.
- 10 20. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man Expressionskassetten, enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 12 bis 19, in eine Ausgangspflanze einführt.
- 15 21. Genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine, durch doppelsträngige ε-Cyclase- Ribonukleinsäuresequenzen verursachte, reduzierte ε-Cyclase-Aktivität aufweisen.
- 20 22. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze eine RNA enthält, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz, enthält, die
- 25 a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen ε-Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen ε-Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.
- 30 23. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.
- 40 24. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Escholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium,

Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla,
Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus,
Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jaca-
randa, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum,
5 Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus,
Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis,
Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron,
Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus,
Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum,
10 Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

25. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 24, dadurch
gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den
Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula.
- 15 26. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem
der Ansprüche 21 bis 25 als Zierpflanzen oder als Futter-
und Nahrungsmittel.
- 20 27. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der
Ansprüche 21 bis 25 zur Herstellung von carotinoidhaltigen
Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungser-
gänzungsmittel.

25

30

35

40

45

49

Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen bio-synthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige ϵ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte ϵ -Cyclase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Carotinoidextrakten.

15

20

25

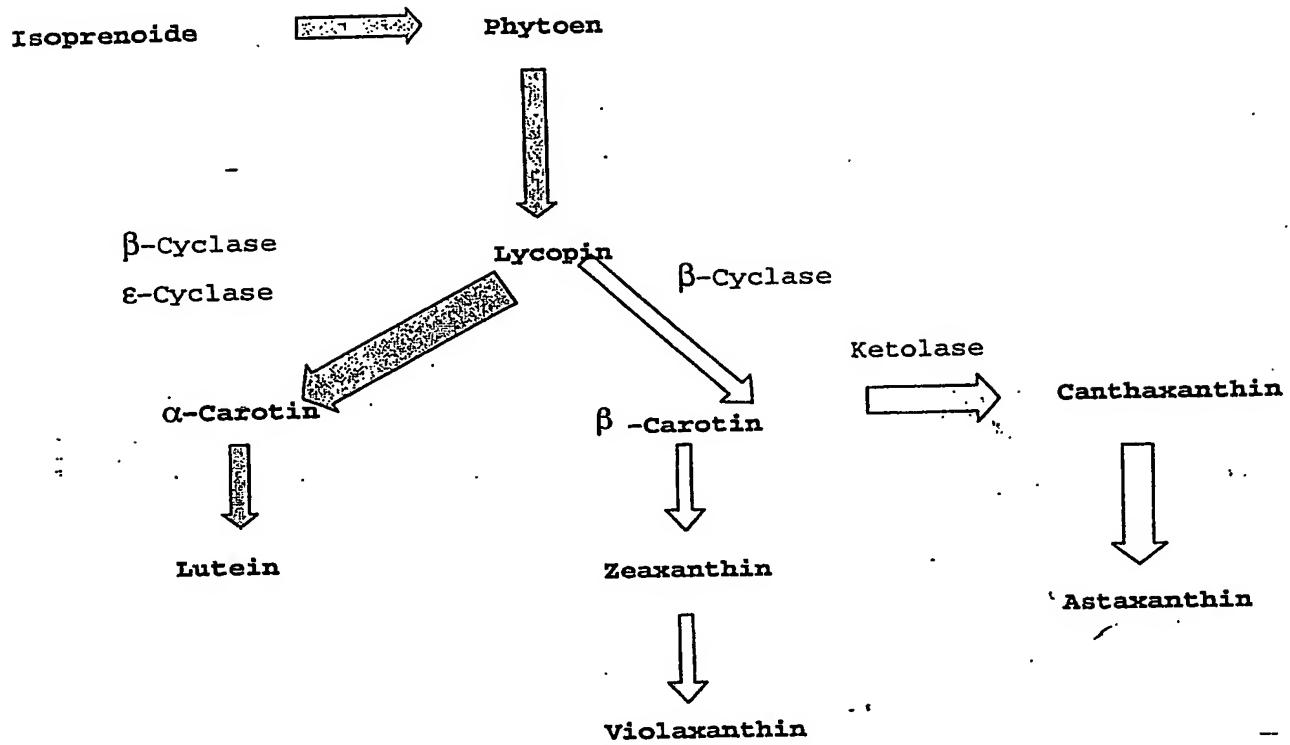
30

35

40

45

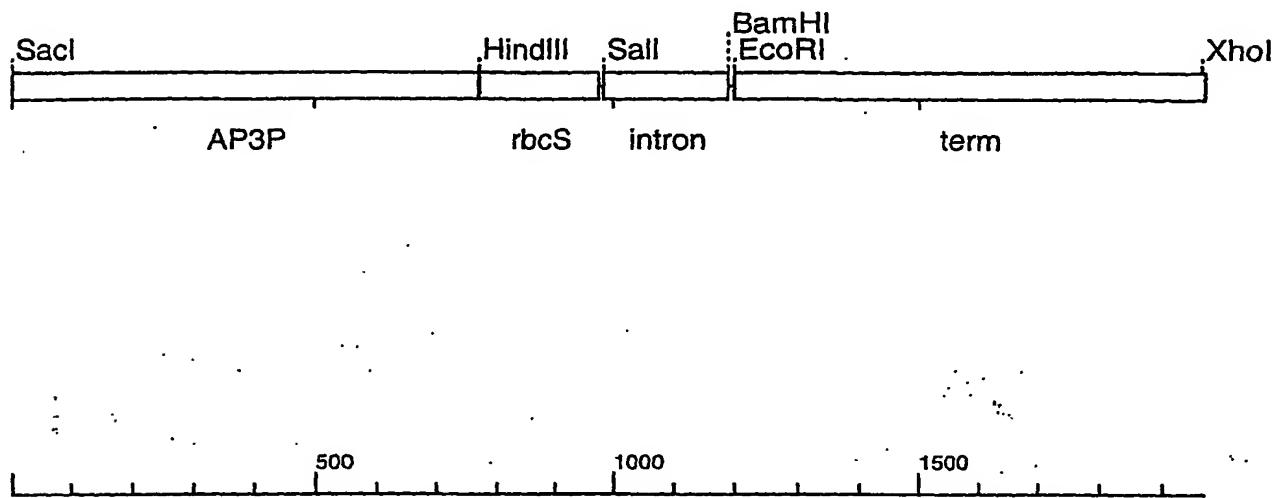
Abbildung 1: Schema der Carotinoidbiosynthese in *Tagetes erecta* Blüten



PF 53864

2/10

Abbildung 2: Klonierungskassette für Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*



pJAI1 (1966 bps)

Abbildung 3: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5' terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promotors

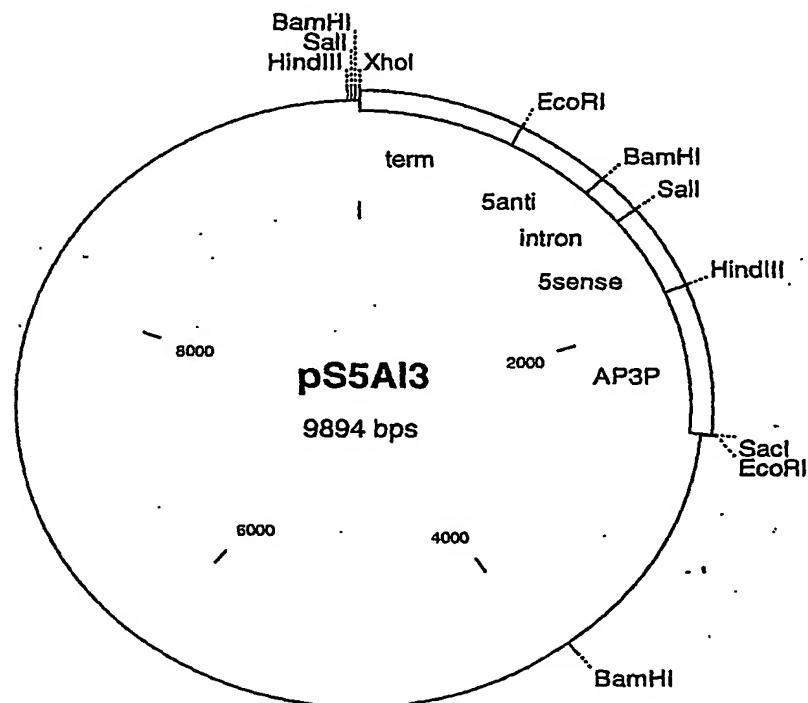


Abbildung 4: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5' terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

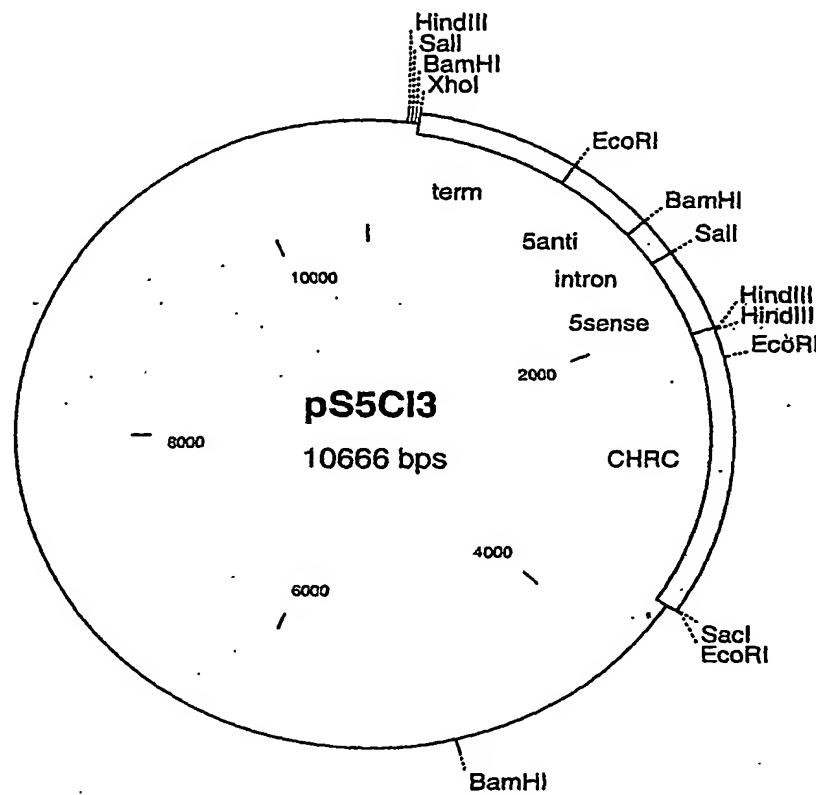
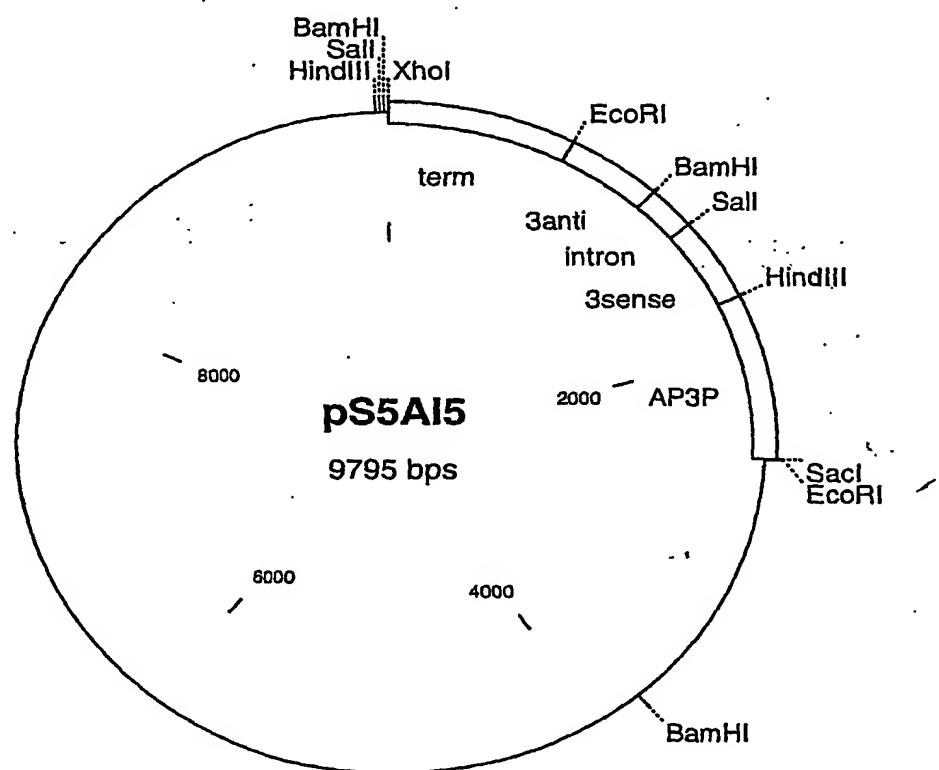


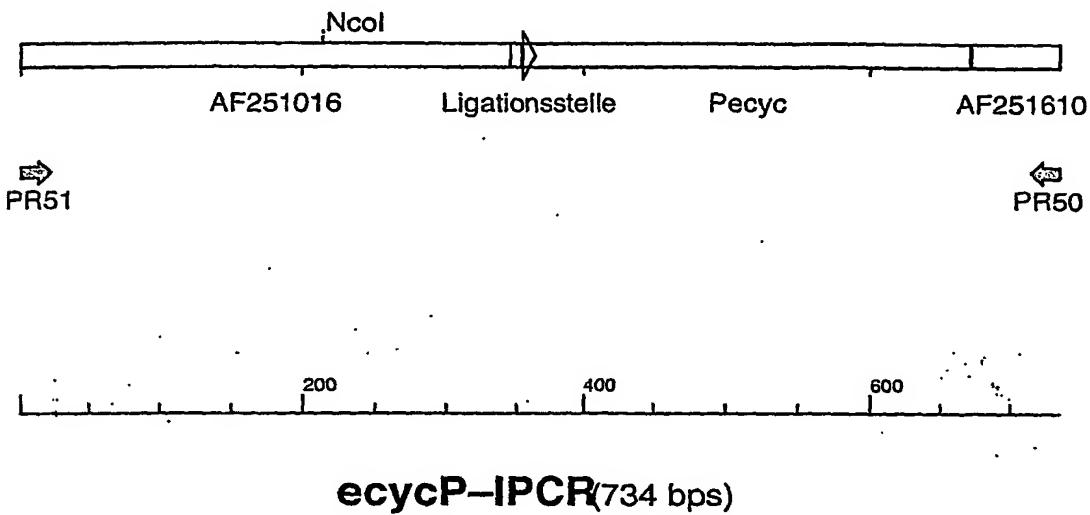
Abbildung 5: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3' terminalen Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promotors



PF 53864

6/10

Abbildung 6: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des
Epsilon-Cyclase Promoters enthält



PF 53864

7/10

Abbildung 7: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

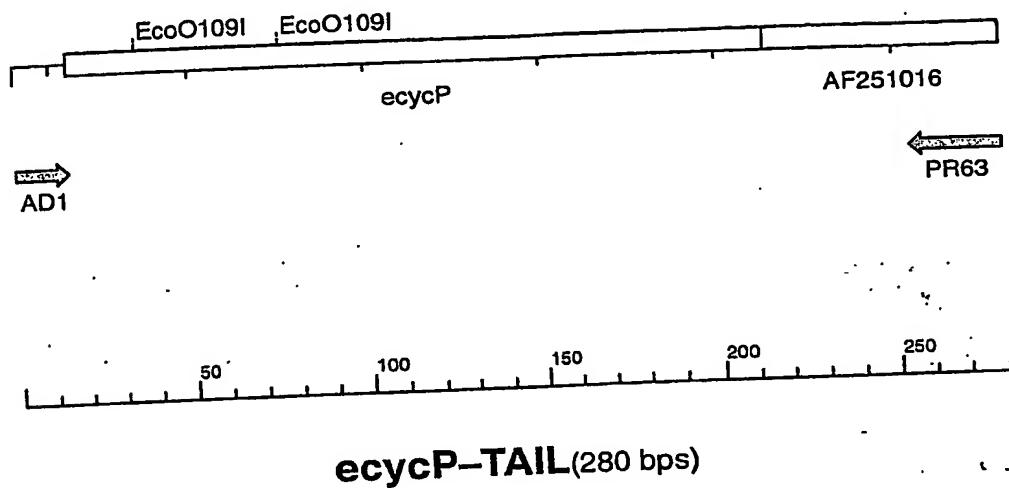


Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

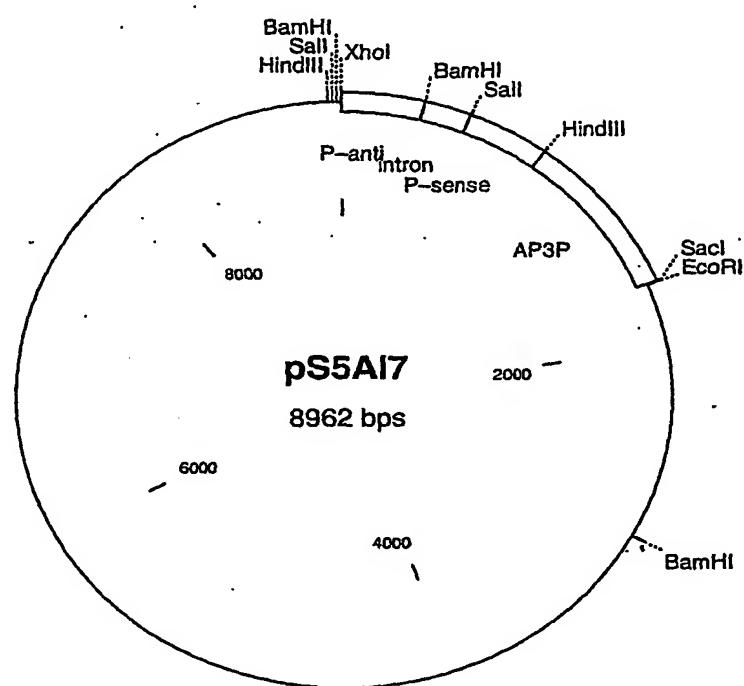


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

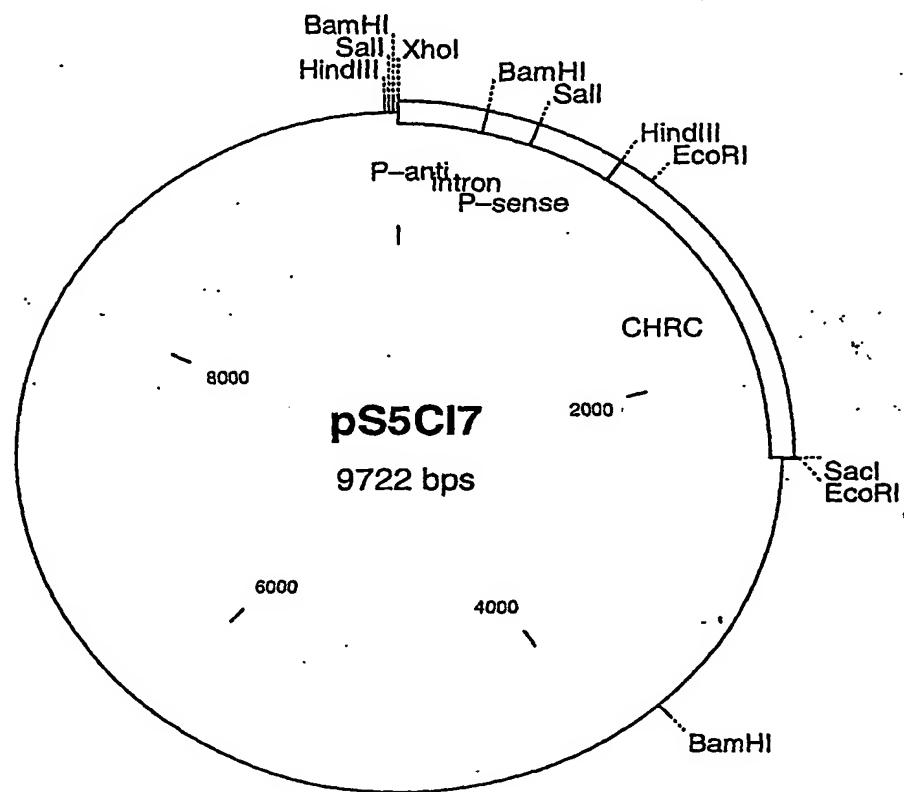
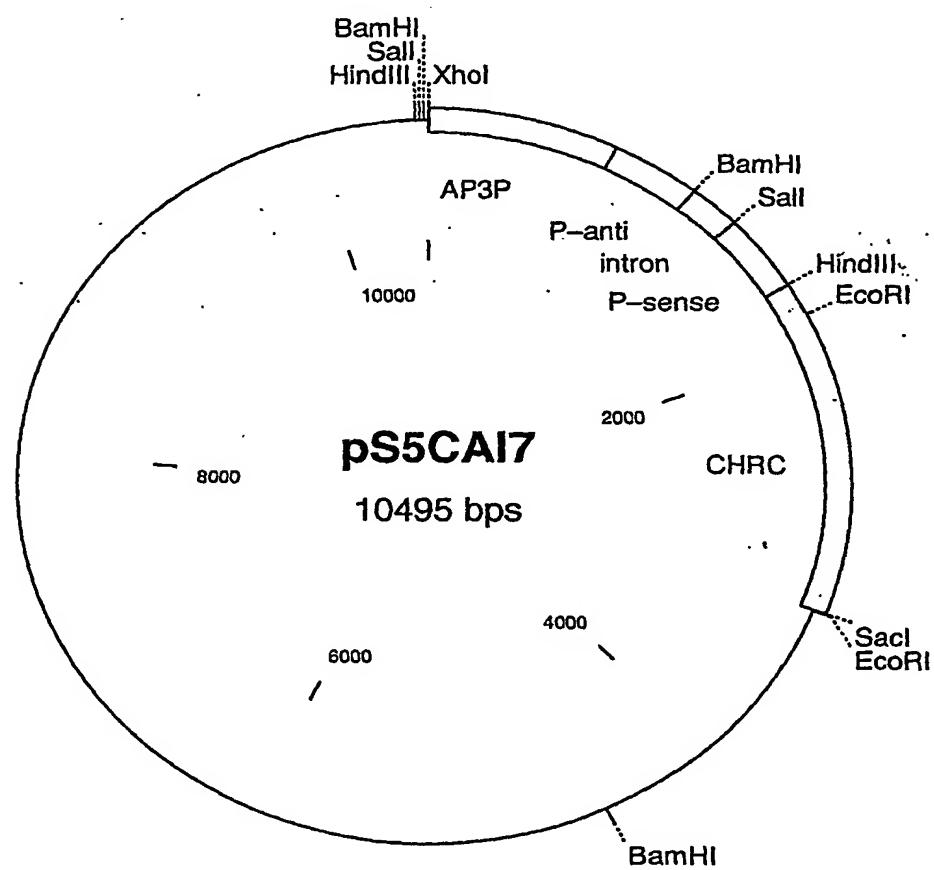


Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH & Co KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetische Zwischen- und/oder Folgeprodukten

<130> NAE 439/02

<160> 43.

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(777)

<223>

<400> 1

gagctcaactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgtat gaactaagat caatccatgt 60

tagtttcaaa acaacagttaa ctgtggccaa ctttagtttg aaacaacact aactggtcga 120

agcaaaaaaga aaaaagagtt tcatacatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga 180

ccaaacatta tctacaaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc tttaacccta 240

ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgtta 300

atcatttggg gaaacatata aaagatttga gtttagatgga agtgacgatt aatccaaaca 360

tatatatctc tttcttctta tttcccaaata taacagacaa aagtagaata ttggctttta 420

acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca 480

aaaagccaac caaatccacc tgcaactgatt tgacgtttac aaacgccgtt aagtcgatgt 540

ccgttgattt aaacagtgtc ttgtatcaa aaaaatcagt ttacataat ggaaaattta 600

tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta ccttcatgg attaggcaat actttccatt 660

tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatccact 720

tctttcttctt cattataatct cttgtcctct ccaccaaatac tcttcaacaa aaagctt 777

<210> 2

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(195)
<223>

<400> 2
tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatata atatataata attatcatta attagtagta 60
atataaatattt tcaaataatattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgcttt 120
ctgttagttta taagtgtgta tatttttaattt tataactttt ctaatataatg accaaaattt 180
gttgatgtgc agctg 195

<210> 3
<211> 212
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Intron
<222> (1)..(212)
<223>

<400> 3
gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatataatatataataata tcattaatta 60
gtagtaatat aatatttcaa atatttttt caaaataaaa gaatgttagta tatagcaattt 120
gcttttctgt agtttataag tggtagtattt ttaattttata acttttctaa tatatgacca 180
aaatttgttg atgtgcaggt atcacccggat cc 212

<210> 4
<211> 1830
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> CDS
<222> (141)..(1691)
<223>

<400> 4
ggcacgaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgttga gagacactcc aatccaaaca 60
gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120
agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr
1 5 10

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg
Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr
15 20 25

aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa
Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln
30 35 40

gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg
Glu Ile Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu
45 50 55

ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc
Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser
60 65 70 75

cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt
Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Asp Ser
80 85 90

aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt
Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu
95 100 105

gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt ate
Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile
110 115 120

ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa
Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu
125 130 135

ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat
Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp
140 145 150 155

act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc
Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala
160 165 170

tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg
Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg
175 180 185

tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att
Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile
190 195 200

act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc
Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile
205 210 215

aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga
Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly
220 225 230 235

aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca
893

Lys Leu Leu Gln Tyr Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr			
240	245	250	
gct tat ggt ata gag gtt gag gaa agc ata ccc tat gat cca agc			941
Ala Tyr Gly Ile Glu Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser			
255	260	265	
cta atg gtt ttc atg gat tat aga gac tac acc aaa cat aaa tct caa			989
Leu Met Val Phe Met Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln			
270	275	280	
tca cta gaa gca caa tat cca aca ttt ttg tat gtc atg cca atg tct			1037
Ser Leu Glu Ala Gln Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser			
285	290	295	
cca act aaa gta ttc ttt gag gaa act tgt ttg gct tca aaa gag gcc			1085
Pro Thr Lys Val Phe Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala			
300	305	310	315
atg cct ttt gag tta ttg aag aca aaa ctc atg tca aga tta aag act			1133
Met Pro Phe Glu Leu Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr			
320	325	330	
atg ggg atc cga ata acc aaa act tat gaa gag gaa tgg tca tat att			1181
Met Gly Ile Arg Ile Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile			
335	340	345	
cca gta ggt gga tcc tta cca aat acc gag caa aag aac ctt gca ttt			1229
Pro Val Gly Gly Ser Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe			
350	355	360	
ggt gct gct agc atg gtg cat cca gcc aca gga tat tcg gtt gta			1277
Gly Ala Ala Ala Ser Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val			
365	370	375	
aga tca ctg tca gaa gct cct aat tat gca gca gta att gca aag att			1325
Arg Ser Leu Ser Glu Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile			
380	385	390	395
tta ggg aaa gga aat tca aaa cag atg ctt gat cat gga aga tac aca			1373
Leu Gly Lys Gly Asn Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr			
400	405	410	
acc aac atc tca aag caa gct tgg gaa aca ctt tgg ccc ctt gaa agg			1421
Thr Asn Ile Ser Lys Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg			
415	420	425	
aaa aga cag aga gca ttc ttt ctc ttt gga tta gca ctg att gtc cag			1469
Lys Arg Gln Arg Ala Phe Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln			
430	435	440	
atg gat att gag ggg acc cgc aca ttc ttc cgg act ttc ttc cgc ttg			1517
Met Asp Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu			
445	450	455	
ccc aca tgg atg tgg tgg ggg ttt ctt gga tct tcg tta tca tca act			1565
Pro Thr Trp Met Trp Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr			

PF 53864

5

460

465

470

475

gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser
480 485 490 1613

ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga
Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly
495 500 505 1661

aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataaactctag tcgcgatcag
Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile
510 515 1711

ttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct 1771

tacatcaaca cagtcatcaa ttgtatcttct tgggtaatg ctgatgaagt atttctgg 1830

<210> 5

<211> 516

<212> PRT

<213> Tagetes erecta

<400> 5

Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr
1 5 10 15

Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys
20 25 30

Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu
35 40 45

Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met
50 55 60

Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu
65 70 75 80

Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp
85 90 95

Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu
100 105 110

Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro
115 120 125

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly
130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu
145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly
180 185 190

Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg
210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr
225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met
260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln
275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe
290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu
305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile
325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser
340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser
 355 360 365

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu
 370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn
 385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp.
 450 455 460

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe
 465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu
 485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile
 515

<210> 6
 <211> 445
 <212> DNA
 <213> tagetes erecta

<220>
 <221> Sense-Fragment
 <222> (1)..(445)
 <223>

<400> 6
 aagcttgcac gaggcaaagc aaagggttgtt tgggttgtt gttgagagac actccaatcc

aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtt ctaacaacag caacgaagaa	120
aaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cgccaacaat	180
ggcggctttt acatgcccta ggttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagt	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgcttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc	360
acagtctagc ctatccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg tcgac	445

<210> 7
 <211> 446
 <212> DNA
 <213> *Tagetes erecta*

 <220>
 <221> Antisense Fragment
 <222> (1)..(446)
 <223>

<400> 7	
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggttgtt tggtgttgtt gttgagagac actccaatcc	60
aaacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcggtt ctaacaacag caacgaagaa	120
aaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cgccaacaat	180
ggcggctttt acatgcccta ggttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagt	240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt	300
gaaagccggt ggatcggagc tgcttttgt tcaaatgcaa cagaataagt ccatggatgc	360
acagtctagc ctatccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa	420
ctgtatactg gatttggttg gatcct	446

<210> 8
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> *Tagetes erecta*

 <220>
 <221> Sense Fragment
 <222> (1)..(393)
 <223>

<400> 8

PF 53864

9

aagctttgga ttagcactga ttgtccagat ggatatttag gggacccgca cattcttccg 60
gactttcttc cgcttgcaca catggatgtg gtgggggttt cttggatctt cgttatcatc 120
aactgacttg ataataatttg cgtttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat 180
gggtctgggtt agacattgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct 240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag ttttagattt aggcacatct tgcatatatata 300
tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcatcaa ttgtatttct 360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac 393

<210> 9
<211> 397
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> AntisenseFragment
<222> (1)..(397)
<223>

<400> 9
gaattctctt tggatttagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct 60
tccggacttt cttccgccttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttggga tcttcgttat 120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catgcacccg catgcctga 180
gaatgggtct ggttagacat ttgcattctg acccgacagg aggaacaatg taaaagcgt 240
atctcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagtttaga ttataggcac atctgcata 300
tatatatgtt taaaccttat gtgtgctgtt cccttacatc aacacagtca ttaattgtat 360
ttcttgggtt aatgctgatg aagtatttcc tggatcc 397

<210> 10
<211> 1537
<212> DNA
<213> -

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1537)
<223>

<400> 10
gagctctaca aattagggtt actttattca ttttcatcca ttctctttat tgttaaattt 60
tgtacatttta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctcactttct tattcataacc 120

tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatcaa taacttatttct acttcatttt	180
tcacgttttt aacatcttcc ttatattctt gtccacttcg tttagggatg cctaattgtcc	240
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt	300
aatacaaata aagtgaaaca aaatatctat aaataaaacaa atatataatat ttgttagac	360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg	420
tttctcatat ttaccttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaaagc	480
taaacccat taaatagct aactataaga tctaaaattt atcctcatca gtgtatagtt	540
taattggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctatctt	600
ctcacatttt ttaacttaag aaaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat	660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tatttattta aataaaaaag actaataat	720
atataaaatg aatgttcata cgcaagacca tttagagatg agtatgctt cacatgctga	780
gattattttc aaaactaagg ttgttagcaat attaaatcaa taaaatttattt ataaataaca	840
aaatthaacct gctcggttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaaatta aactaaagat	900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attatgtttt acatattaat tcaggagctg	960
cacaacccaa ttctattttc gttccttgggt ggctgggttt ctcacaaggt tcaatagtca	1020
atattaggtt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga actaaaaat	1080
tgtatataat atttaggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca	1140
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttgg cgccctcacat gttcggttg gtcgcttta	1200
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctttccta tgccacgtgt tctgagctta	1260
acaagccacg ttgcgtgcca ttgccaaaca agtcattttt acttcacaag gtccgatttg	1320
acctccaaaa caacgacaag ttccgaaca gtcgcaaga tcaagggtat aatcgcttt	1380
ttgaattcta ttctcttta tttaatagtc ccttcgtgt gatagttttt aaaagatttt	1440
taaaaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag ttgtgtctt tttgtgtttt	1500
gtttctctga ttacggaat ttggaaataa taagctt	1537

<210> 11
 <211> 734
 <212> DNA
 <213> kuenstliche Sequenz

 <220>
 <221> variation

<222> (1)..(734)
<223>

<400> 11
ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcgcc ttttacatgc 60
cctagggtta tgacttagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc 120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtggatcg 180
gagctgctt ttgttcaaata gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc 240
caaaaggta ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgtttt taggaataat 300
gatatttaga tagattagct atcacctgtg ctgtggtgtg cagctcccaa gggtcttacc 360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttgggaggtg ggggattata ggcttttgtg 420
tgagaatgtt gagaaagagg tttgacaaat cggtgttga atgaggttaa atggagttta 480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga gggtgatgg gatattaaag acggscata 540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggttaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct 600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta 660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttggttt 660
ttgttgttgc tgagagacac tccaatccaa 720
acagatacaa ggcg 734

<210> 12
<211> 280
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> variation
<222> (1)..(280)
<223>

<400> 12
gtcgagtagt ggttcaatt aaaataaaga gaagaraaaag attaagaggg tgatggggat 60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acataacaacg 120
tggctttaaa agatggcttg gctgctaattc aactcaactc aactcatatc ctatccattc 180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaagggtgt ttgttgttgc 240
tggttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga 280

<210> 13
<211> 358

<212> DNA
 <213> Tagetes erecta

<220>
 <221> (Sense) Promotor
 <222> (1)..(358)
 <223>

<400> 13
 aagcttaccg atagtaaaat cgtagttat gattaatact tgggaggtgg gggattata 60
 gctttgttgt gagaatgttg agaaagagg tgcacaaatc ggtgtttgaa tgaggtaaa 120
 tggagttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180
 cggccaatat agtgcgtcc cgtagaaaaa ggtaaatgaa aacataacaac gtggctt 240
 aagatggcct ggctgctaact caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300
 tcaattctat tgaatgc 358..
 aaa gcaagcaaa gcaaagg tttgttgtg ttgtcgac

<210> 14
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> Tagetes erecta

<220>
 <221> (Antisense) Promotor
 <222> (1)..(361)
 <223>

<400> 14
 ctcgagctt ccgatagtaa aatcgtagt tatgattaat acttggagg tggggatta 60
 taggcattgt tgtgagaatg ttgagaaaga gtttgacaa atcggtgtt gaatgagg 120
 aaatggagtt taattaaat' aaagagaaga gaaagattaa gagggtgatg gggatattaa 180
 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaat gaaaacatac aacgtggc 240
 taaaagatgg ctggctgct aatcaactca actcaactca tatcctatcc attcaattc 300
 aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgttgtg ttgtggatc 360
 c 361

<210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>
 <221> Primer

PF 53864

13

<222> (1)..(28)
<223>

<400> 15
gagtcactc actgattcc attgcttg

28

<210> 16
<211> 37
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(37)
<223>

<400> 16
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 17
<211> 34
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(34)
<223>

<400> 17
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 18
taagctttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

PF 53864

14

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 19
gaaaatactt catcagcatt acc

23

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 20
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 21
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 22
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 22
aagcttgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 23

15

<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 23
gtcgacacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(30)
<223>

<400> 24
aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 25
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 25
gaattcgcac gaggcaaagc aaaggttg

28

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(25)
<223>

<400> 26
aagctttgga ttagcactga ttgtc

25

<210> 27
<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 27
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 28
<211> 29
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(29)
<223>

<400> 28
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(27)
<223>

<400> 29
gaattctctt tggatttagca ctgattg

27

<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 30
cgcccttgtat ctgtttggat tgg

23

<210> 31
<211> 24
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(24)
<223>

<400> 31
ctaacaatca atgagttatga gagg

24

<210> 32
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 32
agagcaaggc cagcaggacc acaacc

26

<210> 33
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
<223>

<400> 33
ccttgggagc ttttgggata ggctag

26

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 34

tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 35

<211> 15

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(15)

<223>

<400> 35

gtcgagtagt gagtt

15

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 36

aagcttaccg atagtaaaat cgtagtt

28

<210> 37

<211> 31

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 37

ctcgagctta ccgatagtaa aatcgtagt t

31

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 38
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 39
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223> . .

<400> 39
qqatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 40
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 40
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 41
<211> 28
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
<223>

<400> 41
ctcqagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 42

PF 53864

20

<211> 22
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)...(22)
<223>

<400> 42
gagctctaca aatttagggtt ac

22

<210> 43
<211> 23
<212> DNA
<213> kuenstliche Sequenz

<220>
<221> Primer
<222> (1)...(23)
<223>

<400> 43
aagcttatta ttccaaatt ccg

23

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.